

**SEPARATION AND PURIFICATION OF POLY-beta-HYDROXY LACTIC ACID**

Patent Number: JP63198991  
Publication date: 1988-08-17  
Inventor(s): NUMAZAWA RYOZO; others: 03  
Applicant(s): MITSUBISHI RAYON CO LTD  
Requested Patent: ☒ JP63198991  
Application Number: JP19870030955 19870213  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P7/62; C08G63/74  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PURPOSE:** To efficiently separate and purify PHB from a bacterium cell, by carrying out the treatment from extraction to separation from extract residue under high temperature using a dioxane-containing solvent as an extract solvent.  
**CONSTITUTION:** A bacterium (e.g. bacterium belonging to the genus *Pseudomonas* or the genus *Alcaligenes*) having ability capable of accumulating PHB (poly-beta- hydroxylactic acid) is cultivated in a culture medium containing carbon source, nitrogen source, phosphoric acid source, the other minerals and a slight amount of nutritive source to provide a bacterium cell containing accumulated PHB. 5-20pts. of an extract solvent containing > 80wt.% 1,4-dioxane is added to 1pt.wt. of the dried bacterium cell and the PHB is extracted at  $\geq 60$  deg.C, especially  $\geq 80$  deg.C and an extracting solution is separated from an extract residue under heating at  $\geq 60$  deg.C and a solvent insoluble to PHB is added to the liquid after removing the residue to solidify PHB and the solvent is removed to give the purified PHB.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-198991

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)8月17日

C 12 P 7/62  
C 08 G 63/74

NLT

7236-4B  
6904-4J

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の分離精製法

⑯ 特 願 昭62-30955

⑰ 出 願 昭62(1987)2月13日

⑱ 発 明 者	沼 沢	亮 三	広島県大竹市御幸町20番1号	三菱レイヨン株式会社内
⑱ 発 明 者	宮 森	隆 雄	広島県大竹市御幸町20番1号	三菱レイヨン株式会社内
⑱ 発 明 者	崎 前	明 宏	広島県大竹市御幸町20番1号	三菱レイヨン株式会社内
⑱ 発 明 者	大 西	久 雄	広島県大竹市御幸町20番1号	三菱レイヨン株式会社内
⑲ 出 願 人	三菱レイヨン株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番19号			
⑲ 代 理 人	弁理士 吉沢 敏夫			

明 細 書

1. 発明の名称

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の分離精製法

2. 特許請求の範囲

1. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸(以下PHBという)を含有する菌体より、該ポリマーを抽出精製する方法において、その抽出溶剤としてジオキサン含有溶剤を用いて菌体からPHBを抽出し、次いで抽出液と抽出残渣とを分離することを特徴とするポリ-β-ヒドロキシ酪酸の分離精製法。

2. 抽出から抽出残渣の分離まで抽出液の温度を60℃以上に保持することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のポリ-β-ヒドロキシ酪酸の分離精製法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は菌体からポリ-β-ヒドロキシ酪酸を分離精製する方法に関する。更に詳しくは菌

体からポリ-β-ヒドロキシ酪酸を溶剤抽出することから成るポリ-β-ヒドロキシ酪酸の分離精製法に関するものである。

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸(以下PHBと略す)は細菌例えばシヌードモナス(Pseudomonas)、アルカリゲネス(Alcaligenes)、アゾトバクター(Azotobacter)属等に属する細菌の菌体内に顆粒状に蓄積され、熱可塑性、生物分解性、生体吸収性等の特性を有することから農業用高分子素材、医療用高分子素材として有用な天然高分子物質である。

[従来の技術]

PHBの製造は上記の細菌を培養し、菌体内に顆粒状に蓄積せしめた後、菌体を培養液より集菌し、その菌体から分離精製して行なわれる。その分離精製は菌体とPHB抽出溶剤と接触せしめ、菌体よりPHBを抽出し、次いでその抽出液からPHB以外の菌体あるいは菌体が破壊されて生成する菌体成分例えば細胞壁、菌体内蛋白質等の不溶成分(以下抽出残渣という)と

を分離し、その分離液より溶剤を除去することで行なわれる。

抽出溶剤としては、従来クロロホルム、塩化メチレン（特開昭57-65193号）、ビリジン（米国特許第3044942号）等が用いられている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかし、これ等の抽出溶剤を用いる場合にはP H Bを高濃度に溶解した液は極度に粘性が高く、その中に含まれる不溶解濁物を分離除去することが困難である。そこで、従来法では抽出液からの残渣の分離において通常分離操作を適用しようとする系系の粘性を下げる必要がある、そのためには菌体量に対して大量の抽出溶剤を用いることが必要となり、溶剤コストがかさみ経済的な方法とはいえない。さらにビリジンを用いた場合はP H Bの分子量の低下も生じ分子量の高いものが得られない。

〔問題点を解決するための手段〕

そこで、本発明者等は高濃度にP H Bを溶解

P H Bを菌体内に蓄積した細菌細胞であり、その細菌としてはアゾトバクター・ビネランディイ（*Azotobacter vinelandii*）、アルカリゲネス・ユウトロフ（*Alcaligenes eutroph*）、ズーグレア・ラミゲラ（*Zooglia ramigera*）、バチルス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）等のP H Bを蓄積する能力を有する細菌である。

その菌体は上記の細菌をグルコース、フラクトース等の炭水化物またはメタノール、酢酸等の炭素源、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、ペプトン等の窒素源、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム等のリン酸源、その他細菌の増殖に必要なミネラル、微量栄養源を含む培地で好氣的に培養し、その培養液から遠心分離等の方法で集菌することにより得られる。その菌体を更に乾燥したもの、またはメタノール、アセトン等の脂質溶剤で洗浄したものも菌体として用いることができる。

ジオキサン含有溶剤とは抽出溶剤中に1,4-ジオキサンが80重量%以上含有されているも

しても粘性増加が少なく、分子量低下のない抽出溶剤について鋭意検討を重ねた結果、意外にも室温ではP H Bをほとんど溶解しないジオキサンが60℃以上ではP H Bの良溶剤となつてP H Bを高濃度に溶解することを見出し、更に菌体よりP H Bを抽出する際の溶剤としてジオキサン含有溶剤を用いた場合、高温下で高濃度にP H Bを溶解した液では粘性の増加が低く、通常分離操作を行つても抽出液から抽出残渣を分離することが容易であること、また高温下加熱しているにもかかわらず、このような溶剤、伊過の過程でP H Bの分子量の低下がないことを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明はP H Bを含有する菌体より、該ポリマーを抽出精製する方法において、その抽出溶剤としてジオキサン含有溶剤を用いて菌体からP H Bを抽出し、次いで抽出液と抽出残渣とを分離することを特徴とするポリマー-ヒドロキソ酸の分離精製法に関する。

本発明においてP H Bを含有する菌体とは、

のであればよく、20重量%未満の範囲でその他のP H B溶解性溶剤またはP H B非溶解性溶剤が含まれていてもよい。1,4-ジオキサンが80重量%未満ではP H Bの溶解性が低くなつたり、P H B溶液の粘度が高くなつたり、P H Bの劣化をもたらしたりする恐れがあるので好ましくない。

抽出に際して菌体と抽出溶剤との割合は菌体に含まれるP H Bの分子量及び含有量によって異なるが、乾燥菌体重量1部に対して抽出溶剤5～20部が適当である。その抽出温度は60℃以上であることが好ましく、80℃以上であることがより好ましい。

ジオキサン含有溶剤を抽出溶剤として用いることで分子量の低下がなく高濃度にP H Bを含む抽出液を得ることができ、その抽出温度では高濃度にかかわらず抽出液の粘性増加は少ない。

以上のような抽出溶剤で抽出して得られた抽出液は60℃以上の加温下で抽出液中に含まれる残渣の除去が容易に行なわれる。その除去方

法としては伊過または遠心分離法を用いることができる。

次いで残渣を除去した液をPHBの非溶剤例えばメタノール、*n*-ヘキサンメタノール-水混合液等に注ぎPHBを凝固せしめた後、溶剤を除去し、精製PHBを得ることができる。

#### 〔実施例〕

以下実施例で説明する。

##### 実施例1

アゾトバクター・ビネランダーIFO1358をグルコース3重量%、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.1重量%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5重量%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4重量%を含有する培地5ℓで34℃、30時間通気攪拌にて培養し、遠心分離により集菌した後、乾燥してPHB含有率50重量%の乾燥菌体45ℓを得た。

この乾燥菌体40ℓを400mlの1,4-ジオキサンに懸濁し、101℃攪拌下で3時間PHBの抽出を行なった。

この抽出液を100℃に加温しながら、内径

10容量%含有する1,4-ジオキサン溶液400mlに懸濁し、100℃で5時間攪拌下でPHBの抽出を行なった。この抽出液を80℃に保持しながら実施例2と同様な方法で伊過した。伊液はほぼ一定の流速で速やかに流出し、清澄な液となった。この液を実施例1と同様な処理を行ない15ℓの精製PHBを得た。その分子量は156万で高分子量のPHBであることが確認された。

10cmの加圧伊過器でケーキ伊過を行なった。圧力としては1.0kg/cm<sup>2</sup>ゲージで行なった。目詰りも少なく伊過でき、その伊液は清澄なものが得られた。

この伊液を*n*-ヘキサン2ℓ中に注入し、凝固沈殿した後、その沈殿物を分離し、乾燥することで約18ℓの精製PHBを得た。

このPHBの分子量は約160万で分離精製による分子量低下は見られなかった。

##### 実施例2

実施例1で用いたと同様な乾燥菌体40ℓを400mlの1,4-ジオキサンに懸濁し、80℃で5時間攪拌抽出した。この抽出液をそのまま80℃に保持しながら、内径10cmの伊過器を用い、1.0kg/cm<sup>2</sup>ゲージ圧でケーキ伊過した。伊液はほぼ一定の流速で清澄な液が得られた。この伊液を実施例1と同様の処理を行ない17ℓの精製PHBを得た。

##### 実施例3

実施例1で用いたと同様な乾燥菌体40ℓを

特許出願人 三菱レイヨン株式会社

代理人 弁理士 吉 沢 敏 夫

